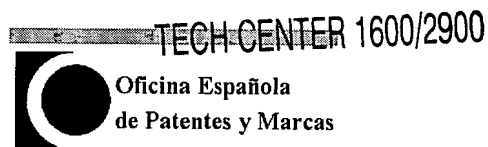




MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGIA

RECEIVED

NOV 13 2002



#8

CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 9901383, que tiene fecha de presentación en este Organismo el 22 de Junio de 1999.

Madrid, 21 de octubre de 2002

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.

M MADRUGA



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y
MARCAS

INSTANCIA DE SOLICITUD DE:

☒ PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD

(1) <input type="checkbox"/> SOLICITUD DE ADICION <input type="checkbox"/> SOLICITUD DIVISIONAL <input type="checkbox"/> CAMBIO DE MODALIDAD <input type="checkbox"/> TRANSFORMACION SOLICITUD EUROPEA	(2) EXPED. PRINCIPAL O DE ORIGEN MODALIDAD NUMERO SOLICITUD FECHA SOLICITUD MODALIDAD NUMERO SOLICITUD FECHA SOLICITUD	NUMERO DE SOLICITUD 20001383 FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN O.E.P.M. 99 JUN 22 10:20 FECHA Y HORA DE PRESENTACION EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.
(3) LUGAR DE PRESENTACION Madrid		CODIGO 28

(4) SOLICITANTES(S)	APELLIDOS O DENOMINACION JURIDICA	NOMBRE	DNI
Consejo Superior de Investigaciones Cientificas			Q28/18002D

(5) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE	
DOMICILIO Serrano, 117	TELEFONO 91 585 50 00
LOCALIDAD MADRID	CODIGO POSTAL 28006
PROVINCIA MADRID	CODIGO PAIS ES
PAIS RESIDENCIA ESPAÑA	CODIGO NACION ES
NACIONALIDAD ESPAÑOLA	

(6) INVENTORES	(7) <input type="checkbox"/> EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR <input checked="" type="checkbox"/> EL SOLICITANTE NO EL INVENTOR O UNICO INVENTOR	(8) MODO DE OBTENCION DEL DERECHO <input checked="" type="checkbox"/> INVENC. LABORAL <input type="checkbox"/> CONTRATO <input type="checkbox"/> SUCESION	
APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD	COD. NACION
Cebolla Ramirez	Angel	Española	ES
Sousa Martín	Carolina	Española	ES
De lorendo Prieto	Victor	Española	ES

(9) TITULO DE LA INVENCION
Procedimiento de superexpresión de genes regulada por un circuito genético en cascada.

(10) INVENCION REFERENTE A PROCEDIMIENTO MICROBIOLOGICO SEGUN ART. 25.2 L.P.	<input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO
--	--

(11) EXPOSICIONES OFICIALES	
LUGAR	FECHA

(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAIS DE ORIGEN	COD. PAIS	NUMERO	FECHA

(13) EL SOLICITANTE SE ACOGE A LA EXENCION DE PAGO DE TASAS PREVISTA EN EL ART. 162 L.P.	<input type="checkbox"/> SI <input checked="" type="checkbox"/> NO
--	--

(14) REPRESENTANTE	APELLIDOS	NOMBRE	CODIGO
DOMICILIO	Ojeda García	Pedro	00000
Serrano, 113	LOCALIDAD	PROVINCIA	COD. POSTAL
	MADRID	MADRID	28006

(15) RELACION DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN		FIRMA DEL FUNCIONARIO
<input checked="" type="checkbox"/> DESCRIPCION. Nº DE PAGINAS..... 13 <input checked="" type="checkbox"/> REIVINDICACIONES. Nº DE PAGINAS. 2 <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS. Nº DE PAGINAS..... 4 <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE PRIORIDAD <input type="checkbox"/> TRADUCCION DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD	<input type="checkbox"/> DOCUMENTO DE REPRESENTACION <input type="checkbox"/> PRUEBAS <input checked="" type="checkbox"/> JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASAS <input type="checkbox"/> HOJA DE INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS <input checked="" type="checkbox"/> OTROS Autorización	

(16) NOTIFICACION DE PAGO DE LA TASA DE CONCESION

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa dence-
sion; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de
la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 10-10-86.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

UNE A-4 MOD. 31011

ESPAÑOLA DE PATENTES.

OFICINA



Y MARCAS

DATOS DE PRIORIDAD

(31) NÚMERO

(32) FECHA

(36) PAÍS

A1

(12) PATENTE DE INVENCION

(21) NÚMERO DE SOLICITUD

(22) FECHA DE PRESENTACION

22 JUN 1999

NACIONALIDAD

ESPAÑOLA

(71) SOLICITANTE (S)

Consejo Superior de Investigaciones Cientificas

DOMICILIO Serrano, 117

MADRID

28006

MADRID

(72)

INVENTOR (ES) Cebolla Ramirez

Angel

Sousa Martin

Carolina

De lorendo Prieto

Victor

(73)

TITULAR (ES)

(11)

N.º DE PUBLICACION

(45)

FECHA DE PUBLICACION

(62)

PATENTE DE LA QUE ES
DIVISIONARIA

GRAFICO (SOLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

(51)

Int. Cl.⁷

C12N 15/67, 15/90

(54)

TITULO

Procedimiento de superexpresión de genes regulada
por un circuito genético en cascada.

(57)

RESUMEN

Procedimiento de superexpresión de genes regulada por un circuito genético en cascada.

El objeto de la presente invención es un procedimiento de superexpresión de genes regulada por un circuito genético en cascada en células transformadas. El procedimiento permite mantener unos valores basales muy reducidos y utiliza un sistema de expresión primario nahR/Psal que controla un gen regulador secundario xylS2 que estando situado en un vector movilizable y dentro de secuencias transponibles, puede establecerse en el cromosoma de una gran variedad de bacterias Gram negativas de forma estable, así como un sistema de expresión secundario que contiene el promotor Pm, diana de xylS2, y sitios múltiples de clonación donde pueden insertarse los genes de interés. Esta construcción podrá situarse en el cromosoma o en plásmidos de cepas que contengan el sistema regulador primario. La activación del sistema se hace con compuestos aromáticos derivados del ácido benzoico.

TITULO

Procedimiento de superexpresión de genes regulada por un circuito genético en cascada.

OBJETO DE LA INVENCION

- 5 El objeto de la presente invención es un procedimiento de superexpresión de genes regulada por un circuito genético en cascada activado por salicilato. Mediante el procedimiento de la presente invención se pueden conseguir muy altos niveles de expresión génica, manteniendo unos valores basales muy reducidos. El procedimiento es aplicable a la producción de proteínas terapéuticas, enzimas, hormonas polipeptídicas, factores de crecimiento y apolipoproteínas.

ESTADO DE LA TECNICA

- La superexpresión de genes clonados es muy conveniente cuando se desea purificar una proteína con alguna utilidad, tanto para la industria farmacéutica como para la investigación biomédica. La producción de grandes cantidades de proteínas a través de la clonación del gen que las codifica mediante el uso de técnicas del ADN recombinante, se ha realizado tradicionalmente usando vectores en multicopia con promotores fuertes regulados por proteínas represoras tales como los sistemas basados en el operón de la lactosa (Makrides, Micropiol. Rev. 60:512-538, 1996). Sin embargo, esta estrategia usual conlleva una serie de desventajas:
- 1) El mantenimiento de los vectores de expresión requiere el uso de antibióticos dando lugar a una merma metabólica, y para producción industrial a gran escala, supone un costo adicional del medio de fermentación y la potencial contaminación de productos y deshechos (Nilson y Skogman, Biotechnology, 4:901-903, 1986).
 - 2) Controlar los niveles basales de expresión es muy conveniente para la producción de proteínas que posean cierta toxicidad celular, y para prevenir la selección de mutaciones en la bacteria que disminuyan la expresión del gen de interés y en la proteína recombinante de interés (Mertens y col., Biotechnology 13:175-179, 1995; Vilette y col., Mol. Microbiol. 17:493-504, 1995). Sin embargo, esto es difícil de lograr cuando los genes clonados están en plásmidos multicopia y debido a que el ruido de los promotores más usados tipo *tac* o *trc*, incluso reprimidos, suelen ser bastante elevado. Los sistemas de regulación habituales, basados en un promotor fuerte y un represor codificado por el plásmido, implican una expresión

transitoria del gen hasta que se sintetiza suficiente represor dando lugar a dificultades en la clonación cuando el gen heterólogo codifica una proteína con alguna toxicidad para la bacteria. 3) El inductor usado en los sistemas tradicionales derivados del promotor *lac* (IPTG) es caro para el uso en fermentadores y tiene cierta toxicidad (Figge y col. Cell 52:713-722, 1988). 4) Se ha demostrado que la alta expresión de proteínas recombinantes reduce la tasa de crecimiento celular y consecuentemente, toda la síntesis de proteínas (Bentley y col., Biotechnol. Bioeng. 35:668-681 1990); (Dong y col. J. Bacteriol. 177:1497-1504, 1995). Esto se debe a que los vectores plasmídicos en multicopia usados compiten con la actividad metabólica de la bacteria hospedadora debido a la expresión de otros genes necesarios para el mantenimiento y replicación del plásmido, y que también están amplificados. 5) Gran parte de los vectores de expresión sólo replican en *E. coli*, que tiene limitaciones para la expresión o secreción de ciertas proteínas. Un sistema alternativo que elimina muchos de estos inconvenientes ha sido la utilización de vectores transposones miniTn5 (de Lorenzo y Timmis, Method Enzymol. 235:386-405, 1994) que pueden insertar los genes heterólogos en el cromosoma bacteriano permitiendo una alta estabilidad de los mismos (Cebolla y col. Appl. Environ. Microbiol. 62:214-220, 1993; Suarez y col. Appl. Environ. Microbiol. 63:122-127, 1997). En este último trabajo se describe la producción estabilizada de la toxina pertúsica por la inserción en cromosoma por el mini Tn5 en *Bordetella bronchiseptica* bajo el control de un sistema regulado por salicilato, un inductor 1000 veces más barato que el IPTG (catálogo SIGMA 1998). El sistema regulador se basa en el gen que codifica para un regulador transcripcional positivo *nahR* que se activa por salicilato y su promotor *Psal* (de Lorenzo y col., Gene 130:41-46, 1993). Sin embargo, los niveles obtenidos son relativamente pobres (0,1% de las proteínas totales). Esto se debe sobre todo a que al estar los genes en monocopia en el cromosoma no hay amplificación de la expresión debida a dosis génica. Para aumentar sustancialmente estos rendimientos manteniendo las cualidades de bajo niveles basales, estabilidad, espectro de hospedadores y bajo coste de la inducción, hemos diseñado un sistema en cascada que permite amplificar de 10 a 20 veces la expresión génica del sistema *nahR/Psal* en respuesta a salicilato. Para ello, hemos adicionado otros elementos reguladores, el gen *xylS2* y su promotor diana *Pm*, que responden al mismo inductor y que tienen mayor capacidad de expresión génica que el sistema *nahR/Psal*. La activación del promotor *Pm* por el regulador *xylS2* (Ramos y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8467-8471, 1986)

responde sinérgicamente a la concentración intracelular del mismo y a la presencia de moléculas derivadas del benzoato, que incluyen el salicilato.

EXPLICACION DE LA INVENCION

- 5 El objeto de la presente invención es un procedimiento de superexpresión de genes regulada por un circuito genético en cascada en células transformadas. El procedimiento permite mantener unos valores basales muy reducidos y utiliza un sistema de expresión primario *nahR/Psal* que controla un gen regulador secundario *xylS2* que estando situado en un vector movilizable y dentro de secuencias transponibles, puede establecerse en el
- 10 cromosoma de una gran variedad de bacterias Gram negativas de forma estable, así como un sistema de expresión secundario que contiene el promotor *Pm*, diana de *xylS2*, y sitios múltiples de clonación donde pueden insertarse los genes de interés. Esta construcción podrá situarse en el cromosoma o en plásmidos de cepas que contengan el sistema regulador primario. La activación del sistema se hace con compuestos
- 15 aromáticos derivados del ácido benzoico.

- En el procedimiento de la invención los sistemas de expresión primario y secundario se encuentran en vectores transposones que permiten su inclusión en el cromosoma de las células transformadas o bien el sistema de expresión primario se encuentra en vectores transposones que permiten su inclusión en el cromosoma de la célula transformada y el
- 20 sistema secundario está situado en un plásmido.

- Las células transformadas pueden ser bacterias gram negativas y en particular *E.coli*. El inductor utilizado habitualmente es salicilato y los sistemas de expresión primario y secundario pueden estar constituidos por reguladores similares a *nahR* y a *xylS*, al menos en un 22%.

- 25 El procedimiento objeto de la presente invención puede utilizarse para superproducir polipéptidos como enzimas, hormonas, factores de crecimiento, apolipoproteínas y proteínas terapéuticas o para diagnóstico en general.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

- 30 Figura 1. Esquema del circuito regulador. El cassette regulador *nahR/Psal::xylS2* produce alta cantidad de XylS2 en presencia de salicilato. La proteína XylS2 es activada a su vez por la presencia del inductor salicilato multiplicando el efecto estimulador del

salicilato en la activación de *Pm*. Se produce entonces una producción amplificada de la proteína heteróloga.

Figura 2. Esquema de los vectores realizados para la construcción del circuito genético de expresión. A) vectores mini Tn5 contruidos. El dibujo superior representa el esqueleto de los plásmidos suicidas pUT con origen de replicación R6K (*oriR6K*), el gen de la transposasa (*tnp**), el gen de la b-lactamasa que confiere resistencia a ampicilina (*bla*), un origen de movilización del plásmido (*mob*), y las secuencias de inserción (extremo I y extremo O) que se representan como barras rellenas por líneas horizontales. Bajo esa misma base se encuentran el cassette regulador en pCNB4-S2 y el cassette de expresión en pTSPm. El sitio de restricción *NotI* es raro al reconocer 8 nucleótidos lo que hace infrecuente la presencia del mismo en los genes heterólogos. B. Esquema del vector de expresión pCCD5 linearizado que contiene el promotor *Pm* antes de un MCS donde se puede clonar el gen de interés. Tiene un origen de replicación de M13 que permite realizar plásmido monocadena. Se muestra la estrategia de clonación de los distintos fragmentos que dieron lugar a una fusión *lpp*'-'*ompA*'-'*phoA* que fue probada como ejemplo de funcionamiento.

Figura 3: Esquema ejemplo de una estrategia para la construcción de vehículos mini Tn5 para inserción en monocopia de genes heterólogos por transposición. *tnp** es el gen de la transposasa. Extremo I y extremo O son las secuencias de inserción sustrato de la transposasa, cuyo contenido se transpone a la cepa receptora. El sitio *NotI* sirve para introducir entre las secuencias de inserción cualquier gen clonado previamente en vectores auxiliares (pUC18Not en el dibujo) que contienen sitios de clonación múltiples flanqueados por sitios *NotI* (Tabla 1).

Figura 4: Comparación de la expresión de $\beta\beta\beta$ en unidades Miller (MU) con el sistema de reguladores en cascada y con los mismos reguladores en circuitos sencillos. A: cinética de la expresión de *lacZ* con los sistemas *nahR/Psal* (cuadrado), *xyIS2/Pm* (triángulo), y *nahR/Psal::xyIS2/Pm* (círculo) en cromosoma, en ausencia (símbolos vacíos) o en presencia de salicilato 2 mM (símbolos rellenos). B: producción de β a distintas concentraciones de salicilato con el sistema *nahR/Psal* (círculo relleno), *xyIS2/Pm* (triángulo) o *nahR/Psal::xyIS2/Pm* (círculo vacío).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Usando genes reguladores clave en los circuitos de control de la expresión de operones catabólicos se han demostrado las bases racionales para construir cascadas regulatorias que amplifican la capacidad de expresión génica en respuesta a compuestos aromáticos derivados del ácido benzoico. En base al mecanismo de activación del promotor *Pm* por los niveles y la actividad específica mediada por efector de su regulador XylS, se ha acoplado la expresión del mutante *xylS2*, cuyo producto es activado por la presencia de salicilato, al sistema de control *nahR/Psal* que también es activo en presencia del mismo efector. Por tanto, la adición de salicilato o algunos compuestos derivados, es capaz de aumentar la concentración intracelular y la actividad de XylS2, dando lugar a una alta actividad del promotor *Pm*. Cualquier gen que se clone bajo el control de *Pm* será expresado hasta 20 veces más que cuando los sistemas no están acoplados. La aplicación de este circuito regulatorio a la expresión del gen que codifica la β -galactosidasa dio lugar a la obtención de más del 11% de las proteínas totales incluso cuando todos los genes estaban establecidos de forma estable en el cromosoma bacteriano en ausencia de presión selectiva.

Un sistema de expresión de genes heterólogos ideal debe estar muy bien regulado, es decir, poseer unos niveles no inducidos muy reducidos y una alta expresión en presencia del inductor. Para fermentación a escala industrial, es muy conveniente que el inductor sea barato y que la superexpresión del gen se haga de forma estable sin necesidad de presión selectiva. Esta expresión debería afectar mínimamente la capacidad del cultivo celular de obtener alta densidad de biomasa, y además sería conveniente que el vector de expresión se pudiera usar en una gran variedad de cepas bacterianas. La expresión inducida por salicilato usando el sistema de *nahR/Psal* en el cromosoma de bacterias Gram negativas ha demostrado ser muy estable y bien regulada cuando se introducen el cromosoma bacteriano mediante vectores miniTn5. Sin embargo, los niveles obtenidos son bastante bajos debido a tener una sola copia y de tener una capacidad de inducción limitada. El promotor *Pm* en cambio ha demostrado tener un extraordinario rango de actividades que dependen tanto de la actividad específica de la proteína activadora XylS como de la concentración celular de la misma (Kessler y col., J. Bacteriol. 176:3171-3176). La actividad del promotor *Pm* aparece como difícilmente saturable in vivo. Incluso aumentando extraordinariamente la cantidad intracelular de

XylS, aun sigue generando mayor respuesta cuando se añade su inductor 3-metilbenzoato. Sin embargo, los sistemas de expresión realizados en base a estos elementos *xylS/Pm* mantienen unas cantidades constantes de expresión de *xylS* desperdiciando la capacidad amplificadora potencial que tendría controlar también su concentración intracelular. Esto se podría realizar acoplando la expresión de *xylS* a otro sistema de expresión (sistema primario). Hemos diseñado un circuito regulador dispuesto en cascada que permite unos niveles basales muy bajos en el promotor que exprese el gen heterólogo al producirse poco regulador en ausencia de inductor. En presencia de un inductor para el sistema primario y para el secundario, aumentaría la concentración del activador secundario y la actividad específica de éste. Puesto que en el caso de *xylS* estos dos eventos son sinérgicos, el efecto obtenido sobre *Pm* sería multiplicativo. Si un mismo efector pudiera inducir ambos procesos, el sistema de expresión se simplificaría. Esta invención describe como esto se puede realizar acoplando al sistema de expresión que responde a salicilato, *nahR/Psal*, el gen *xylS2* (Ramos y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8467-8471), que es un mutante de *xylS* que, manteniendo sus propiedades, responde a salicilato además de benzoato. Un fragmento de 1.2 Kb con el gen *xylS2* se clonó por digestión total con *HindIII* y parcial con *NcoI* en los mismos sitios de pFH2 (Tabla 1). El plásmido pNS2 resultante fue digerido con *NotI* y el fragmento con *xylS2* se insertó en el plásmido pCNB4 para poner el gen regulador bajo el control del sistema *nahR/Psal* que se encuentra dentro de las secuencias de inserción mini Tn5 (de Lorenzo y col., Gene 130:41-46). Se obtuvo así el plásmido pCNB4-S2 (Figura 2A). Debido a que éste plásmido tiene un origen de replicación R6K (Kahn y col., Meth. Enzymol. 68:268-280), sólo replican en cepas que expresen la proteína π , lo que en *E. coli* se consigue por medio de lisógenos del fago λpir . Mediante la cepa donadora de vectores mini Tn5 S17-1(λpir) es posible transferir el cassette regulador a otras cepas Gram negativas por conjugación biparental y posterior selección de la transposición por marcadores selectivos del minitransposon de la bacteria receptora (Herrero y col., J. Bacteriol. 172:6557-6567; de Lorenzo y Timmis, Method Ezymol. 235:386-405). Para verificar que es una inserción por transposición y que el plásmido R6K no se ha introducido, se chequean las colonias por la pérdida de resistencia a penicilinas por la presencia del gen de la b-lactamasa del plásmido suicida. De esta forma, cualquier cepa en la que se inserte el cassette regulador resultante, *nahR/Psal::xylS2*, producirá el regulador XylS2 en

respuesta a salicilato (Figura 1). Estas cepas generadas podrán ser utilizadas para insertar mediante conjugación o transformación un segundo cassette o vector que contenga el promotor *Pm* fusionado al gen de interés. Para ello, la presente invención cuenta con dos vectores complementarios de expresión donde se clonarán los genes cuya superexpresión se desee. Uno de ellos, pTSPm, es un vector mini Tn5 que contiene dentro de las secuencias de inserción un gen de resistencia a estreptomicina, el promotor *Pm* y un sitio de restricción raro *NotI* tras él (Figura 2A). Para su construcción, un fragmento con el interposón omega (Fellay y col., Gene 52:147-154) se insertó dentro sitio *BamHI* del vector pUC18Sfi-*Km^R*-*xylS*-*Pm*-Sfi (de Lorenzo y col, Gene 130:41-46). El plásmido resultante se digirió con *SfiI* y el fragmento mayor fue clonado dentro del esqueleto pUT de un vector mini Tn5 (Herrero y col., J. Bacteriol. 172:6557-6567) para obtener el plásmido pTSPm. En su sitio *NotI* se clonarian genes que hayan sido previamente clonados en vectores auxiliares que contienen sitios múltiples de clonación flanqueados por sitios *NotI* (Tabla 1).

Un segundo vector de expresión complementario con origen de replicación ColE1 (pCCD5) contiene el promotor *Pm* previo a un sitio de clonación múltiple con un inicio de traducción bueno, donde se puede insertar el gen de interés (Figura 2B). Para la construcción de pCCD5, un fragmento *ApoI* que contenía el terminador transcripcional *rrnBT1* producido como un fragmento de PCR resultante de la reacción ADN de *E. coli* como molde y de los oligos 5'-GCAAATTTCCAGGCATCAAATAA and 5'-GGGAATTCCTGGCAGTTTATGG, se clonó dentro del sitio *EcoRI* de pFH2. En el vector resultante, se originaba previo al MCS un sitio único *EcoRI*, donde se clonó un fragmento *ApoI* de 0,4Kb con el promotor *Pm* obtenido por PCR usando los oligos

5'-GTGTCAAATTTGATAGGGATAAGTCC-3' y
5'-GCCTGAATTCAGGCATTGACGAAGGCA-3'

y el plásmido pUC18Sfi-*Km^R*-*xylS*-*Pm*-Sfi como molde. El plásmido resultante pCCD5, podría ser transformado en cepas que contengan el cassette regulador en cromosoma para sobreexpresar el gen heterólogo desde plásmido. Si se desea usarlo de forma estable en monocopia, la fusión *Pm* al gen heterólogo se puede escindir in vitro como fragmento *NotI* y clonarse dentro del sitio *NotI* de una gran gama de vectores mini Tn5 con posibilidad de elegir el marcador más indicado para la aplicación. Existen hasta 8 marcadores genéticos distintos disponibles en vectores mini Tn5 con el sitio *NotI*

adyacente donde se podría clonar las fusiones generadas (de Lorenzo, Trends Biotechnol. 12:365-371). Los vectores resultantes se pueden entonces insertar dentro del cromosoma de la bacteria seleccionada por conjugación.

5 Tabla 1. Plásmidos auxiliares para la clonación en pTSPm

Plásmido	Descripción	Referencia
pUC18Not	Equivalente a pUC18 (Yanish-Perron y col. 1985) pero su sitio múltiple de clonación (MCS) está flanqueado por sitios <i>NotI</i>	(Herrero y col., J. Bacteriol. 172:6557-6567)
p18Not	Equivalente a pUC18 pero con un MCS <i>EcoRI-SalI-HindIII</i> flanqueado por sitios <i>NotI</i>	(Herrero y col., J. Bacteriol. 172:6557-6567)
pVDL8	Vector de bajo número de copias que contiene el mismo MCS que p18Not. Recomendado para clonación de proteínas tóxicas difíciles de mantener en plásmidos de alto número de copias.	(Fernandez y col., Mol. Microbiol. 16:205-213)
pFH2	Origen de replicación de pBR322 y del fago M13. Permite la generación in vivo de proteínas truncadas en los extremos amino y carboxilo, y provee de una buena secuencia de iniciación de la traducción.	(Fernandez y col., Mol. Microbiol. 16:205-213)

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Comparación de la superexpresión del gen de la β mediante el circuito en cascada frente a circuitos simples.

- 10 Para probar la eficacia del circuito amplificador, hemos construido un plásmido que contiene una fusión de *Pm* a *trpA'::lacZ*, clonando éste fragmento en el sitio *NotI* de pTSPm, dando lugar al plásmido pTSPm-lacZ. La fusión construida fue insertada en el cromosoma de CC118 a través de la cepa donadora S17-1(λ pir) que contenía el plásmido pTSPm-lacZ en medio LB-citrato 0.8% para reducir la transfección de λ pir. La
- 15 comunidad de bacterias resistentes a estreptomicina 25 mg/l y rifampicina 50 mg/l, fue usada como receptor en otra conjugación usando *E. coli* S17-1(λ pir) (pCNB4-S2) como

donadora. Para seleccionar los transconjugantes, se seleccionaron colonias resistentes a rifampicina, estreptomycin y kanamicina (25mg/l). Diez colonias sensibles a ampicilina (100mg/ml) se seleccionaron para posterior estudio en ensayos de actividad β -galactosidasa. Se realizaron cultivos bacterianos durante la noche de colonias de cada transconjugante en medio LB (extracto de levadura 5g/l, triptona 10 g/l, NaCl 5 g/l) a 37°C en agitación. Se diluyeron 1:100 veces en medio fresco sin selección antibiótica e incubadas durante 2 horas a 37°C. La suspensión celular se le añadió salicilato a 2 mM y se incubó a 30°C en agitación durante 5 horas. Los niveles de producción sin inductor variaron entre 100 a 400 unidades de Miller dependiendo del transconjugante. La expresión de β -galactosidasa se indujo dramáticamente cuando los cultivos se inducían con salicilato, hasta unos valores de 25000 a 50000 unidades Miller, que correspondían a una tasa de inducción de 150 a 400 veces dependiendo del transconjugante. Para comparar la expresión de *lacZ* desde el nuevo sistema con los otros sistemas tradicionales que responden a salicilato, se usaron inserciones de fusiones *nahR/Psal::lacZ* (pCNB4-*lacZ*) o *xylS2/Pm::lacZ* (pCNB2-*lacZ*) insertados en el cromosoma de *E. coli* CC118 presente en las cepas RSL7 y FH26, respectivamente. La tasa de inducción en respuesta a salicilato y los valores absolutos obtenidos por los sistemas simples fueron 20 veces inferiores que los del sistema en cascada de CC1184S2PT38). Se obtenía una rápida inducción desde los primeros instantes que alcanza un máximo a las 5 horas de la adición de salicilato (Figura 4A). Una concentración de 0,5 mM de salicilato inducía más del 90% de la actividad máxima a las 5 horas de inducción (Figura 4B). Otros compuestos derivados del benzoato, tales como el o-acetil-salicilato, 3-metil-benzoato, o antranilato, demostraron tener una capacidad inductora equivalente o ligeramente superior a la del salicilato. De las diez cepas transconjugantes con el sistema regulador y la fusión promotor-*lacZ* seleccionamos para posterior análisis aquellas con mayor tasa de inducción (CC1184S2PT38) y la que poseía los niveles absolutos de producción más altos (CC1184S2PT97). Un gel de SDS-poliacrilamida (Laemmli 1970) mostró que la acumulación de β -galactosidasa era más del 11 % de las proteínas totales para CC1184S2PT97 y del 9% para CC1184S2PT38, frente a menos del 0.6 % para los sistemas simples (Figura 4).

Tabla 2. Comparación de actividad β -galactosidasa y la estabilidad del gen heterólogo con los sistemas simples y en cascada en distintas configuraciones.

Cepa	Plásmido	a Actividad β -galactosidasa		b β -galactosidasa /proteínas totales (%)		c colonias lac+	
		- 2OHB	+ 2OHB	- 2OHB	+ 2OHB	- 2OHB	+ 2OHB
CC118 λ pir	pTSPm-lacZ	1211	1358	ND ^d	ND	100	100
CC118 λ pir	pCNB2-lacZ	10917	67002	3.6	13	98-81	20-1.5
CC118 λ pir	pCNB4-lacZ	510	17952	ND	3.9	100-97	96-85
CC4S2PMT32	-	171	30383	ND	8.8	100	100
CC4S2PMT97	-	408	39143	ND	11	100	100
CC1184S2 λ pir	pTSPm-lacZ	1487	78257	ND	20	100-99	5-0

Los cultivos se crecieron durante una noche a 37°C en LB con (cepas con plásmidos) o sin ampicilina (150 μ g/ml). Los cultivos se diluyeron 1:100 en el mismo medio sin

- 5 selección antibiótica e incubados durante 2 horas a 37°C. ^aSe incubaron series de suspensiones celulares con o sin salicilato 2mM de concentración final a 30°C. Los niveles de actividad b-galactosidase se midieron enzimáticamente y se tomaron a las 5 horas muestras para estimar la superproducción de proteínas en geles de electroforesis en poliacrilamida-SDS. ^aLas medidas de la cantidad relativa de β -galactosidasa se hizo por
- 10 densitometría de los geles teñidos con coomasie

- El ensayo de estabilidad se realizó realizando cultivos en cultivos discontinuos seriados sin adición de antibióticos selectivos y en presencia o ausencia de salicilato a 30°C. Tras aproximadamente 40 a 50 generaciones, los cultivos se diluyeron para obtener colonias aisladas en medio LB con Xgal. Este compuesto revela la actividad β -galactosidasa en
- 15 placa mediante la acumulación de un producto azul en las colonias. El tanto por ciento de colonias azules frente al total de colonias fue asumido como el porcentaje de bacterias formadoras de colonias que mantienen su capacidad de superexpresar lacZ. Se realizaron

tres experimentos independientes para cada cepa en cada condición. Se muestran los valores máximos y mínimos de los tres experimentos. Las variaciones son altas debido a que el evento de pérdida de la capacidad de expresar *lacZ* es muy favorecedor para una población bacteriana y dependiendo de lo temprano del evento estocástico, se genera una gran variación de las poblaciones bacterianas debido también a la naturaleza exponencial del crecimiento bacteriano. Aquellos casos con resultados repetitivos se muestran con valor único.

dN determinado, =0.5%

Puesto que la amplificación de la expresión podría incrementarse si el regulador/promotor simple estuviera en el plásmido debido al incremento de la dosis génica, exploramos la conveniencia de usar distintas configuraciones de activador/promotor para superproducción de proteínas. Para realizar esto, usamos los mismos plásmidos mini Tn5 pero usando la cepa CC118 λ pir donde pueden replicar. Las cepas con plásmidos pCNB4-lacZ o pCNB2-lacZ mostraban incrementos de 10 a 30 veces respecto a la expresión en monocopia indicando el aumento de la dosis génica. La comparación de los sistemas simples en plásmidos frente al sistema en cascada en cromosoma indica que el nivel basal es 3 y 64 veces inferior a las cepas con pCNB4-lacZ y pCNB2-lacZ, respectivamente. En condiciones inducidas, se puede tener unos niveles de producción β -galactosidasa con el sistema en cascada cromosómico más de dos veces superior a los de *nahR/Psal* en plásmidos y entre un 50-80% de la cepa con pCNB2-lacZ. Para combinar el nivel de regulación con mayores niveles de rendimiento de producción, construimos una cepa con el cassette regulador que llevaba también el fago λ pir lisogenizado para permitir la replicación de pTSPm-lacZ. La configuración plasmídica de la fusión de *Pm* al gen heterólogo obtenía los máximos niveles de producción β -galactosidasa y un más bajo nivel basal de expresión respecto de la cepa con pCNB2-lacZ. Sin embargo, hemos demostrado que la estabilidad del sistema en cascada en cromosoma en condiciones de superexpresión es del 100% en las condiciones que empleamos. En cambio, los sistemas plasmídicos mostraban poblaciones bacterianas que perdían la capacidad de producir β -galactosidasa en una extensión que se correlacionaba con la actividad mostrada en los ensayos enzimáticos a las 5 horas de inducción. Además, en condiciones de inducción, los cultivos finales con el sistema en cascada cromosómico alcanzaban unas densidades de células viables hasta 10 veces

mayores que la superexpresión desde plásmidos. Esta observación explica también por la existencia de otros genes heterólogos de los plásmidos (necesarios para la replicación y su mantenimiento) que también se encuentran en multicopia y cuya sobreexpresión podría afectar significativamente el crecimiento bacteriano.

5 **Ejemplo 2. Uso del sistema en cascada para la superexpresión de una fusión génica *lpp-ompA-phoA*.**

Para evitar los requerimientos de la proteína p en los vectores de expresión construimos el plásmido de expresión basado en Pm con un origen de replicación ColE1. El plásmido pCCD5 se hizo basado en el vector pFH2 (Fernandez y col., Mol. Microbiol. 10 16:205-213), y que incluye un MCS que permite una fácil construcción de genes truncados. pCCD5 contiene un terminador transcripcional (*rrnBT1*) para reducir la lectura a través de promotores aguas arriba a *Pm*. Puesto que todo el cassette de expresión está flanqueado por sitios de restricción del *NotI*, también puede usarse para clonar en vectores mini Tn5 e introducirlo luego en cepas CNB4-S2. Usamos pCCD5 15 para clonar una fusión híbrida *lpp-ompA-phoA* que al codificar una proteína de membrana externa son difíciles de clonar usando los sistemas de expresión habituales, ya que suelen producir un daño celular notable con el mero escape del promotor usado. Para ello, obtuvimos el fragmento *lpp*'-'*ompA* de pTX101 (Francisco y col. 1991) usando los oligos 5'GAGGAATTCAATCTAGAGGGTATTAATA y 5'- 20 CGGGATCCCCGTTGTCCGGACGAGTGCC. El fragmento se digirió con *EcoRI* y *BamHI* e insertado en los mismos sitios pCCD5, resultando el plásmido p5LOA2. El gen de la fosfatasa alcalina *phoA*, fue clonado desde pPHO7 como un fragmento *BamHI* y clonado como fragmento *BamHI* en p5LOA2 (Figura 2B). El plásmido resultante, pLOA2-AP, se introdujo en CC1184S2 mediante transformación. Los cultivos 25 bacterianos con CC1184S2 (p5LOA2-*phoA*) pudieron producir en condiciones de inducción más de un 20% de proteínas totales tras la adición de salicilato, sin poder distinguirse ninguna producción en condiciones no inducidas. La proteína fue superproducida a su máximo nivel entre las dos y tres horas después de la inducción.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento de superexpresión de genes regulada por un circuito genético en cascada en células transformadas, caracterizado porque dicho procedimiento utiliza:

- a) Un sistema de expresión primario *nahR/Psal* que controla un gen regulador secundario *xylS2*,
- b) Un sistema de expresión secundario que contiene el promotor *Pm* y sitios múltiples de clonación de los genes de interés, y
- c) Un inductor de la superexpresión que pertenece al grupo de los compuestos aromáticos derivados del ácido benzoico.

10

2.- Procedimiento de superexpresión según la reivindicación 1, caracterizado porque los sistemas de expresión primario y secundario se encuentran en vectores transposones que permiten su inclusión en el cromosoma de las células transformadas.

15

3.- Procedimiento de superexpresión según reivindicación 1, caracterizado porque el sistema de expresión primario se encuentra en vectores transposones que permite su inclusión en el cromosoma de la célula transformada y porque el sistema secundario está situado en un plásmido.

20

4.- Procedimiento de superexpresión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 3; caracterizado porque el inductor es salicilato.

5.- Procedimiento de superexpresión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 4, caracterizado porque las células transformadas son bacterias gram negativas.

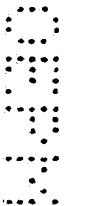
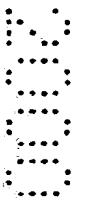
25

6.- Procedimiento de superexpresión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5, caracterizado porque la célula transformada es *E. coli*.

30

7.- Procedimiento de superexpresión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 6, caracterizado porque los sistemas de expresión primario y secundario están constituidos por reguladores similares a *nahR* y a *xylS*, al menos en un 22% de la cadena aminoacídica.

8.- Utilización del procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 7 para superproducir polipéptidos como enzimas, hormonas, factores de crecimiento, apolipoproteínas, y proteínas terapéuticas o para diagnóstico en general.



22 06 1999 08:44

16

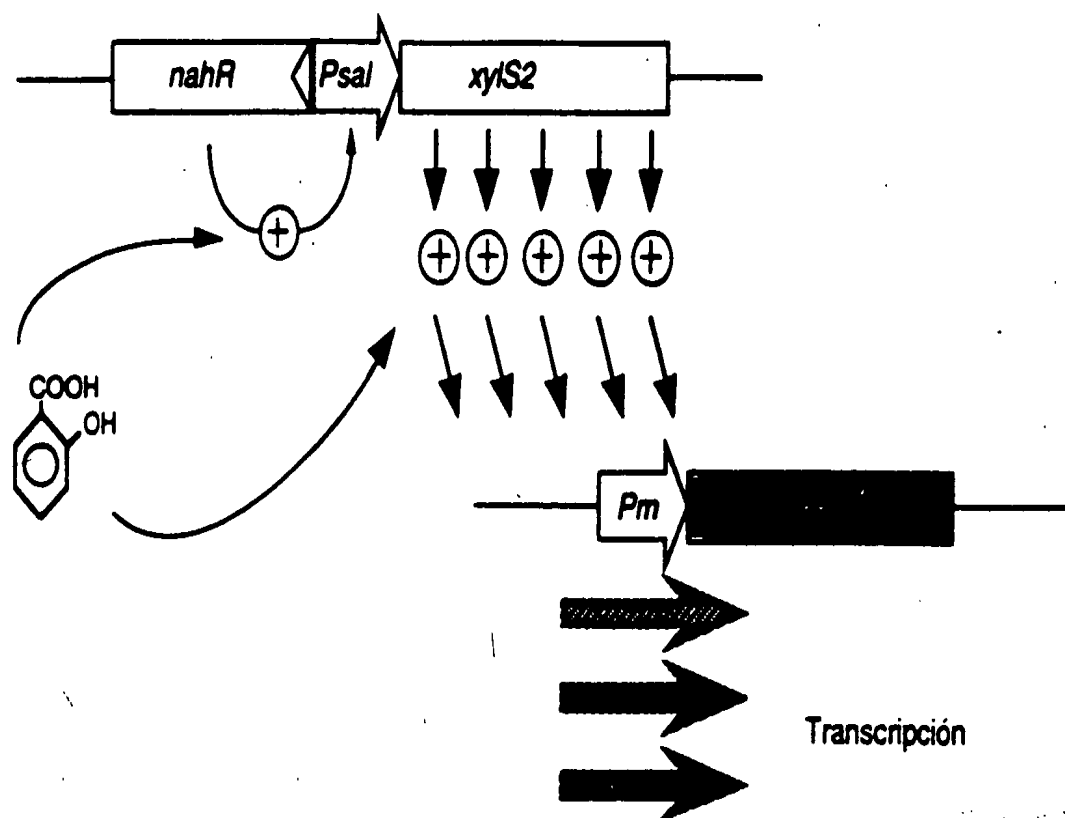
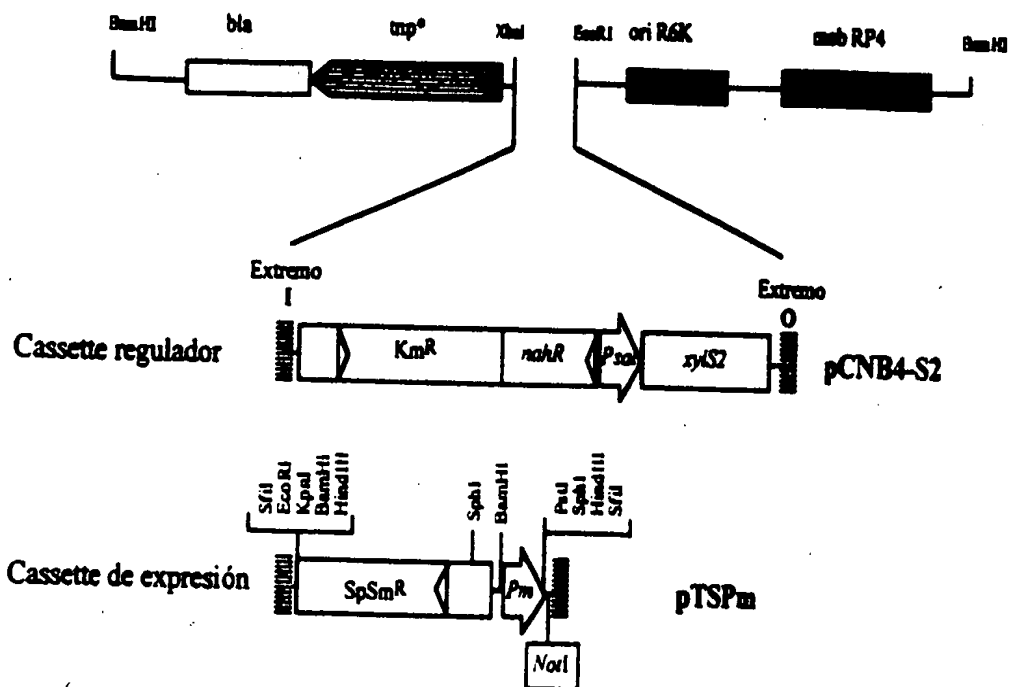


Figura 1

A



B

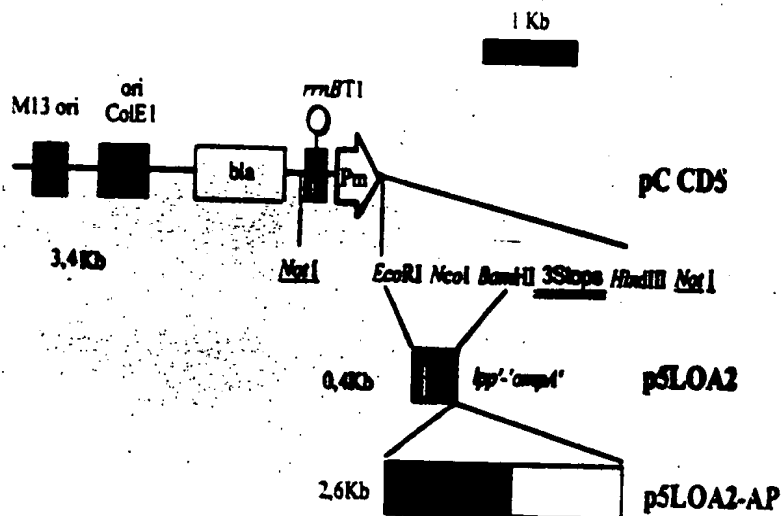
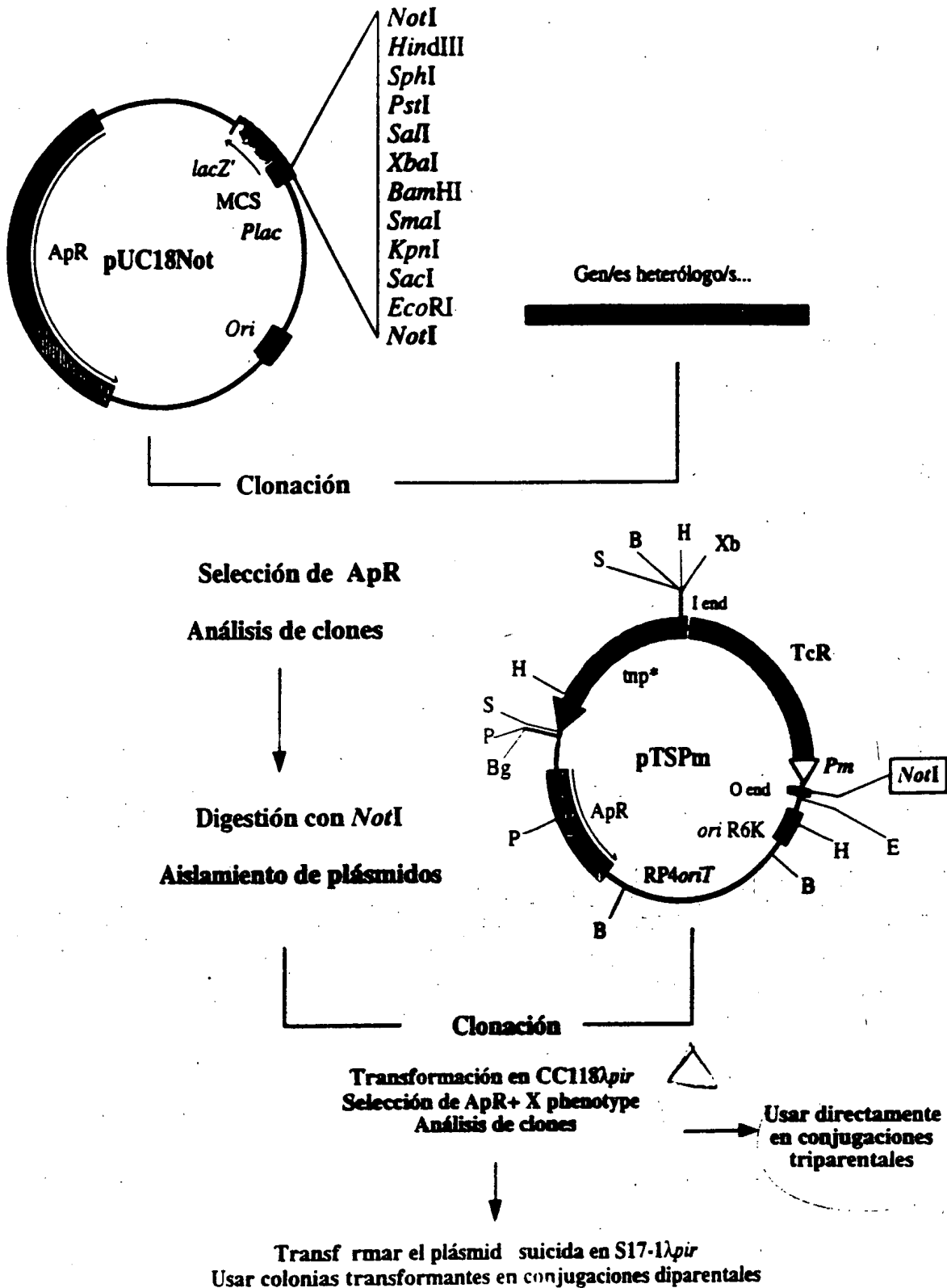
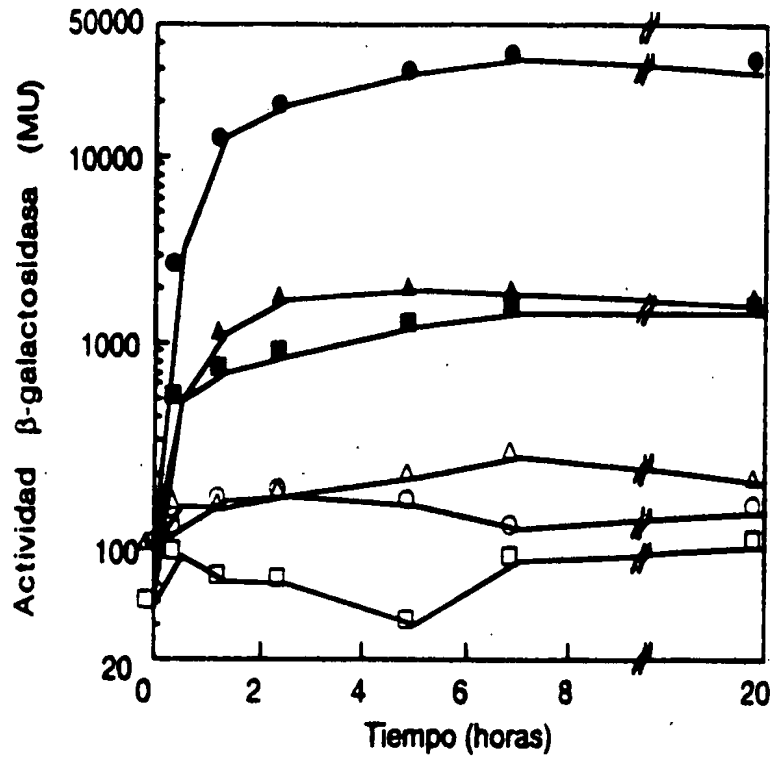


Figura 2



A



B

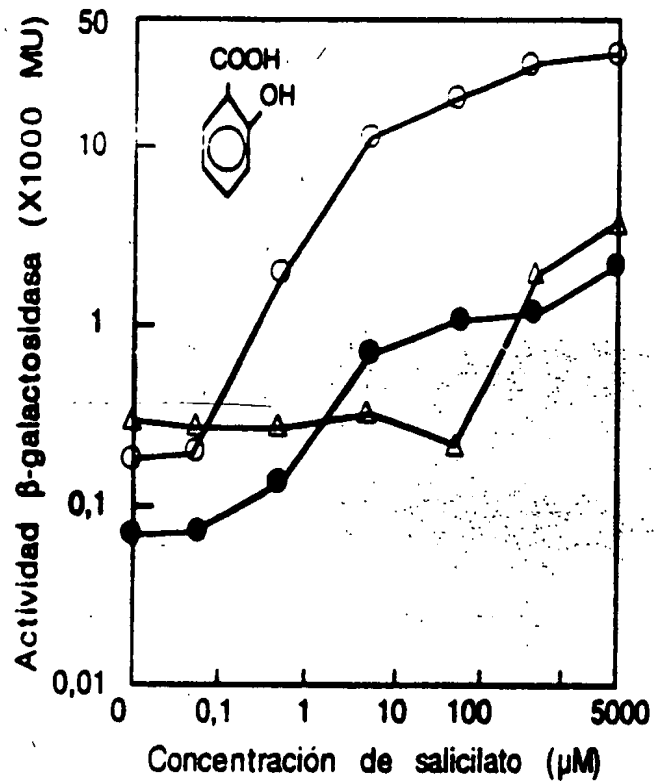


Figura 4